

Victoria Ibañez ● Javier Terol ● José Carbonell<sup>1</sup> ● Roberto Alonso<sup>1</sup> ● Antonio López-García Usach  
 José M. Colmenero-Flores<sup>2</sup> ● Vicent Arbona<sup>3</sup> ● Leandro H Estornell ● Concetta Licciardello<sup>4</sup>  
 Ana Conesa<sup>1</sup> ● Francisco R Tadeo ● Joaquín Dopazo<sup>1</sup> ● Manuel Talón

# IDENTIFICACIÓN INEQUÍVOCA DE VARIEDADES DE CÍTRICOS MEDIANTE COMPARACIÓN GENÓMICA

Centro de Genómica,  
 Instituto Valenciano de  
 Investigaciones Agrarias (IVIA),  
 Apartado Oficial,  
 46113 Moncada (Valencia)

<sup>1</sup> Instituto de Genómica  
 Computacional,  
 Centro de Investigación Príncipe  
 Felipe (CIPF),  
 C/ Eduardo Primo Yufera 3,  
 46102 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Instituto de Recursos Naturales y  
 Agrobiología (IRNAS).  
 Consejo Superior de Investigaciones  
 Científicas (CSIC).  
 Av. Reina Mercedes 10,  
 41012-Sevilla

<sup>3</sup> Departament de Ciències Agràries i  
 del Medi Natural, Universitat Jaume I.  
 Campus Riu Sec.  
 E-12071 Castelló, Spain

<sup>4</sup> CRA-ACM, Consiglio per la Ricerca e  
 la Sperimentazione in Agricoltura,  
 Corso Savoia 190,  
 95024 Acireale (Catania) Italia

## Resumen

En los últimos años, el uso de marcadores moleculares que identifican cambios polimórficos a nivel del ADN, está jugando un papel cada vez mayor en las aplicaciones biotecnológicas de todo tipo así como en los estudios básicos de genética. Sin embargo, todos los esfuerzos realizados hasta la fecha para discriminar variedades de cítricos próximas y, en particular, variedades derivadas por mutaciones espontáneas e inducidas, han resultado infructuosos. En este contexto, el consorcio CITRUSEQ formado por 3 instituciones públicas, el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, el IRNASE del Consejo Superior de Investigaciones Científicas y la Fundación Centro de Investigación Príncipe Felipe y 6 entidades privadas: Eurosemillas, S.L., Investigación Citrícola Castellón S.A., Anecoop, Special Newfruit Licensing Mediterraneo S.L., GMC Variedades Vegetales A.I.E y Fundación Ruralcaja está desarrollando un número considerable de aplicaciones biotecnológicas basadas en el conocimiento del genoma de los cítricos entre las que se incluyen protocolos y procedimientos de identificación inequívoca de especies y variedades de agríos. En este artículo describimos la estrategia de detección y validación de marcadores de ADN derivados de la comparación genómica que permiten mediante análisis de PCR la discriminación rápida, eficaz y asequible de variedades comerciales generadas por mutaciones espontáneas e inducidas.

armónico de una planificación varietal lógica y sensata, con el consecuente perjuicio del sector industrial citrícola implicado y especialmente de las asociaciones del pequeño agricultor.

El desarrollo de plantaciones ilegales de todo tipo tiene un claro interés lucrativo que vulnera los derechos de los múltiples actores de la citricultura española especialmente de los agricultores honestos que compiten en condiciones de desventaja, de los agricultores innovadores que se arriesgan con la adquisición de nuevas variedades

y luego se sienten defraudados y engañados, de los viveristas que producen y costean la generación de plantas certificadas y, por último, de los propios propietarios y obtentores de las variedades sustraídas. Sin embargo, todos los esfuerzos realizados hasta la fecha para elaborar protocolos basados en el uso de marcadores moleculares para la autenticación de variedades de cítricos, sobre todo de aquellas variedades muy próximas a nivel genealógico como las mutaciones inducidas y espontáneas, no han resultado totalmente satisfactorios.

## Introducción

La carencia de un procedimiento de identificación y autenticación inequívoca de las variedades comerciales de cítricos supone un problema importante en el contexto de la citricultura española actual. Esta circunstancia parece alentar el desarrollo de plantaciones ilegales que escapan al control administrativo, obstaculizando el desarrollo

Existen distintos tipos de marcadores, por ejemplo, marcadores morfológicos, bioquímicos y marcadores moleculares basados en los cambios que experimenta la molécula de ADN (Kumar *et al.* 2009). En el escenario actual, los marcadores de ADN son los más efectivos y por tanto, son los marcadores utilizados habitualmente para el estudio de la genética de los cultivos y en este sentido están revolucionando los procedimientos de biotecnología vegetal. Estos marcadores pueden ser de dos tipos, los que no dependen de la técnica de la "reacción en cadena de la polimerasa" conocida como PCR, como los denominados RFLPs y los marcadores basados en la PCR, como RAPDs, AFLPs, SSRs y SNPs.

Los marcadores SSRs o microsatélites han sido ampliamente utilizados debido a su facilidad de manejo, que requiere en esencia un simple análisis de PCR seguido de una electroforesis en gel desnaturante para la determinación del tamaño del alelo. Estos marcadores presentan un alto grado de información proporcionada por el número de alelos del locus. Sin embargo, en las especies, variedades o clones que derivan de eventos de mutación únicos como la mayoría de las variedades en las que se sustenta la citricultura española, es muy improbable que se modifiquen las secuencias microsatélites. Este hecho limita considerablemente, y en la mayoría de los casos, invalida el uso de estos marcadores para este tipo de variedades de cítricos.

Los SNPs (single nucleotide polymorphism) constituyen un tipo de marcador bi-alélico que está jugando un papel importantísimo en la comprensión de la variabilidad genética y de la diversidad entre

las especies de plantas. El problema con este tipo de marcador es que en principio es muy complicada su identificación sin conocimiento previo de la estructura genómica.

Frente a este tipo de aproximaciones más clásicas, en este trabajo proponemos un procedimiento totalmente original y novedoso que permite la comparación directa de las secuencias de DNA de los genomas (Talon *et al.* 2011) de las distintas variedades. Este método permite extraer las diferencias existentes entre sus secuencias genómicas y obtener de esta forma listados de cambios que permiten la discriminación inequívoca entre variedades extremadamente próximas. A todos los efectos, estos cambios son marcadores moleculares como SNPs, indels (deleiciones/inserciones) de pequeños tamaños y otras alteraciones estructurales que incluyen por ejemplo delecciones de grandes fragmentos cromosómicos. El conjunto de marcadores obtenido de esta forma proporciona una identificación inequívoca de la variedad en cuestión.

El objetivo de este trabajo fue, por tanto, desarrollar herramientas genómicas y biotecnológicas para identificar las variantes en los genomas que permitan la obtención de un listado de marcadores que pueda utilizarse en programas de autenticación de variedades de cítricos.

## Métodos

**Material de cítricos.** Para la secuenciación se seleccionaron especies distintas de cítricos que incluyen miembros representativos de las tres taxones básicos originales de los cítricos (*Citrus máxima* -pummelos-, *Citrus medica* -cítrones- y *Citrus reticulata* -mandari-

nas-) y representantes de cada una de las variedades de cítricos cultivadas en España, como mandarinas, naranjas, limones, pomelos y limas. Los patrones y algunas especies más alejadas de las variedades comerciales también se integraron en este análisis.

## Extracción de ADN

Para la secuenciación de genomas, el ADN genómico se extrajo de hojas jóvenes mediante homogenización en un tampón que contiene poliaminas para estabilizar las estructuras nucleares. El aislamiento de núcleos se llevó a cabo mediante centrifugación a través de un gradiente Percoll y el ADN se recuperó mediante lisis con detergentes y digestión con proteinasa K.

**Secuenciación.** La secuenciación de genomas se realizó en el Centro Nacional de Análisis Genómico con la plataforma Illumina y con un instrumento HighSeq 2000. Se obtuvieron secuenciaciones de entre 8-200 equivalentes genómicos por genotipo. Se construyeron genotecas de extremos pareados con lecturas de 100 pares de bases separadas por fragmentos de 500 pares de bases. Las muestras se prepararon de acuerdo con las instrucciones de la plataforma Illumina, se generaron los correspondientes clusters y se realizó la secuenciación mediante síntesis.

## Plataforma bioinformática y alineamiento de genomas

Se desarrolló una plataforma bioinformática de almacenamiento de los datos generados. Esta plataforma consta de dos elementos: una base de datos de almacenamiento de la información y un portal web de acceso y visualización de datos.



# Plantas como deben ser

SAT nº 6439

Miembro de AVASA

Viveros autorizados por el Ministerio de Agricultura  
para la producción de plantas tolerantes a la tristeza

*Disponemos de todas las variedades*

■ **Clementina:**

Oronules, Orogrande, Clemenules,  
Esbal, Hernandina, Nour, Marisol,  
Arrufalina, Lorelina®.

■ **Híbridos:**

Fortune, Nova, Ortanique.

■ **Naranja:**

Navelina, Navel, Salustiana, Newhall,  
Valencia-Late, Navelate,  
Navel - Lane-Late, Delta Seedles.

■ **Pomelo:**

Star-Ruby, Río Red.

■ **Satsuma:**

Clausellina, Okitsu, Owari.

■ **Limonero:**

Verna, Eureka, Fino.

■ **Pies:**

C. Carrizo, M. Cleopatra,  
Macrophylla, C. Volkameriana,  
Citrumelo, C-35

## NOVEDADES

■ **Clemenrubi.**

■ **Valencia Midnight.**

■ **Power Summer Navel.**

E-mail: [info@viveroscentrales.com](mailto:info@viveroscentrales.com)  
Web: [www.viveroscentrales.com](http://www.viveroscentrales.com)

**Avda. Cataluña, 35 43530 ALCANAR (Tarragona)**  
**Tel.: 977/ 73 11 36 Fax: 977/ 73 06 65**

## Desarrollo de la base de datos genómicos

Se creó una base de datos para toda la información generada. Dado el gran volumen de datos obtenido (la base de datos almacena cerca de 45 mil millones de posiciones de ADN y un total teórico máximo estimado de 7 millones de variantes génicas), sólo se almacenan datos procesados y los resultados de los análisis. Los datos primarios son codificados y almacenados en cintas, con referencias en la base de datos para su recuperación si fuera necesario. El motor de base de datos es MySQL, un potente software que ha demostrado proporcionar un excelente rendimiento.

## Desarrollo de un motor de visualización para información genómica

Dentro de la plataforma bioinformática

se integra un motor de visualización genómica en forma de *genomic browser*, utilizando el modelo Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Se utilizó el sistema *biomart* para las funciones de búsqueda y recuperación de la información y *Blast2GO* para anotar funcionalmente los genes. El visualizador permite la observación conjunta y separada de las diferentes variantes de la base de datos para una o más variedades, así como obtener vistas globales y *zoom-in* más detallados de regiones específicas del genoma.

## Alineamiento de genomas de variedades

Los datos de secuenciación se combinaron para realizar alineamientos del genoma de cada una de las variedades secuenciadas. Para ello se utilizó un genoma haploide de Clementina como

genoma de referencia

## Identificación y caracterización de variaciones puntuales

Los SNPs e indels se identifican mediante un conjunto de distintos algoritmos (GATK). Para todos ellos se realizó una anotación de funcionalidad potencial.

## Identificación de variaciones estructurales

El uso de librerías *pair-ends* en la secuenciación permite la identificación de pares de lecturas con una distancia mayor o menor de lo esperado con respecto al genoma de referencia, lo cual posibilita la identificación de alteraciones estructurales en los genomas secuenciados. De forma complementaria se detectan deleciones cromosómicas mediante el estudio de la pérdida de heterocigosidad.



## Validación de los marcadores mediante PCR

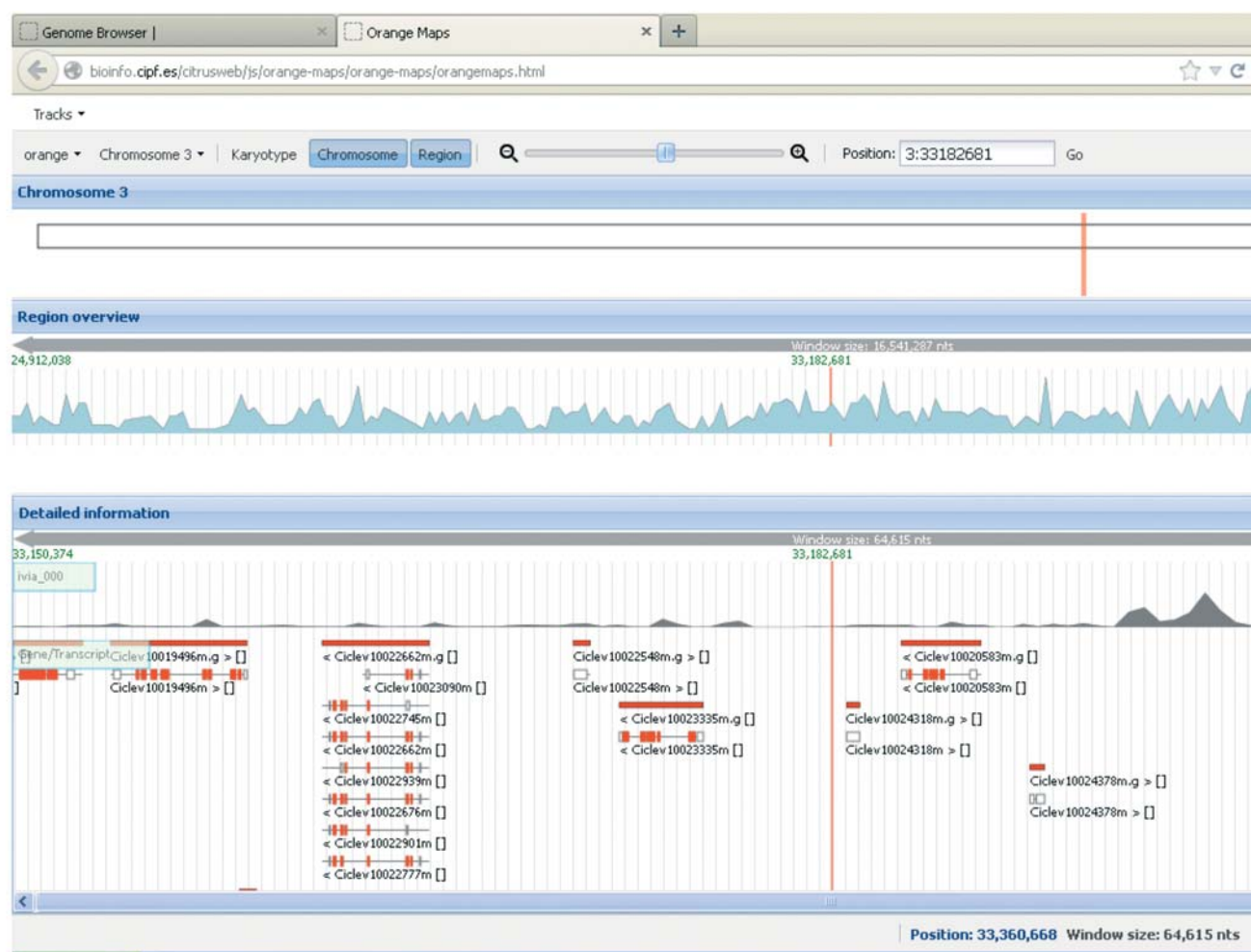
La validación de los marcadores se llevó a cabo mediante PCR clásica y PCR en tiempo real y posterior secuenciación Sanger de los productos de reacción de la PCR. En algunos casos se clonaron los fragmentos de interés y los insertos se secuenciaron para confirmar la presencia de haplotipos distintos.

## Resultados y Discusión

El punto fundamental de este trabajo fue proporcionar un método eficaz para discriminar variedades. El método propuesto se basa en la

comparación genómica de las secuencias provenientes de variedades mutantes, híbridas y parentales. Para alcanzar los objetivos propuestos en primer lugar se dilucidó la secuencia del genoma de 180 variedades de cítricos entre las cuales se incluyen las principales especies, variedades y patrones de la citricultura española. La metodología para la autenticación de variedades se ha ensayado con variedades derivadas aparecidas por mutación espontánea en el campo y otras por mutación inducida mediante irradiación. Así, se desarrollaron los algoritmos matemáticos y los programas informáticos que permiten almacenar y pro-

cesar la información (Figura 1). Posteriormente, mediante los desarrollos informáticos se realizaron las comparaciones entre las variantes genómicas de algunas variedades problema de cítricos y se listaron las diferencias en sus secuencias (Figura 2). Así, se realizó la predicción, por ejemplo, de variantes polimórficas o SNPs (Figura 3) y el set de SNPs de una variedad se comparó con el de variedades derivadas (Figura 4). Puesto que todas las variedades han derivado de un solo evento de mutación, el genoma alterado será idéntico excepto en aquellas regiones afectadas por la mutación.



**Figura 1.** Dentro de la plataforma bioinformática se integra un motor de visualización genómica o “genome browser”. El visualizador permite la observación conjunta y separada de las diferentes variantes de la base de datos para una o más variedades, así como obtener vistas globales y zoom-in más detallados de regiones específicas del genoma. De arriba a abajo se observa la zona representada en el cromosoma, la abundancia génica, las variantes con el respecto al genoma de referencia y los genes presentes en un fragmento ampliado.



# VIVEROS SEVILLA

**Cítricos + Olivos + Ornamentales**

**CENTRAL**  
Ctra. Sevilla-Tocina (A-8.005) Km. 14,700  
41310 BRENES (Sevilla)  
Tel. 95 565 59 20 · Fax 95 565 59 21

**CENTRO HUELVA**  
Ctra. N. Cartaya-Lepe Km. 113  
21440 LEPE (Huelva)  
Tel. y Fax 959 393 820

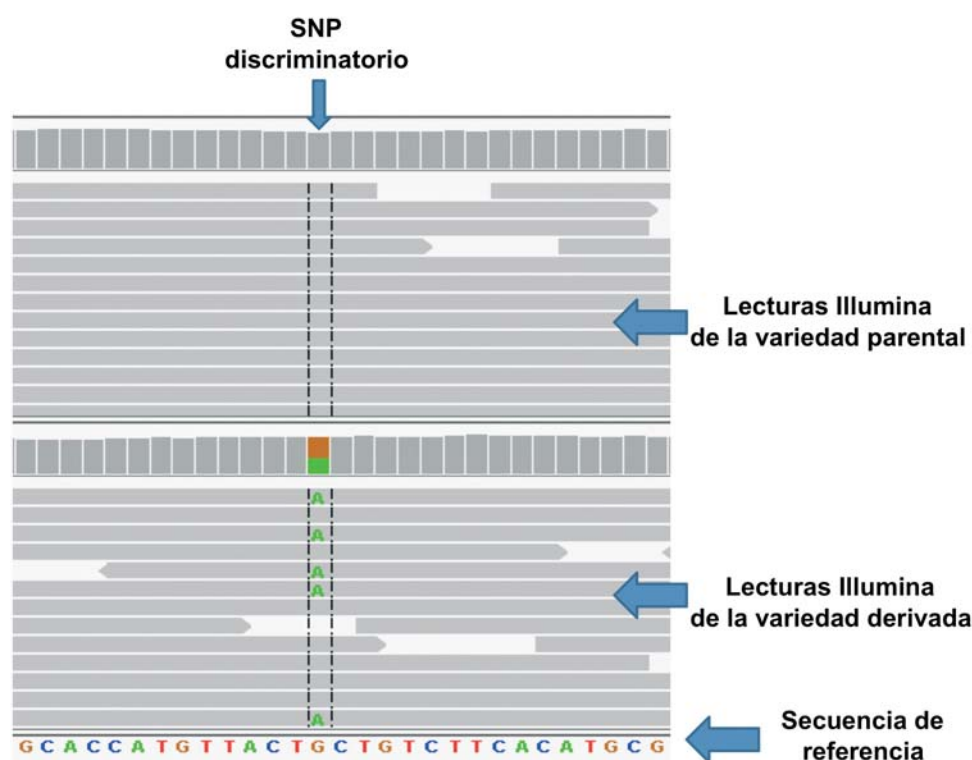
**CENTRO VALENCIA**  
Ctra. Gandía, Km. 19  
46600 ALZIRA (Valencia)  
Tel. 96 245 57 85

[www.viverossevilla.com](http://www.viverossevilla.com)

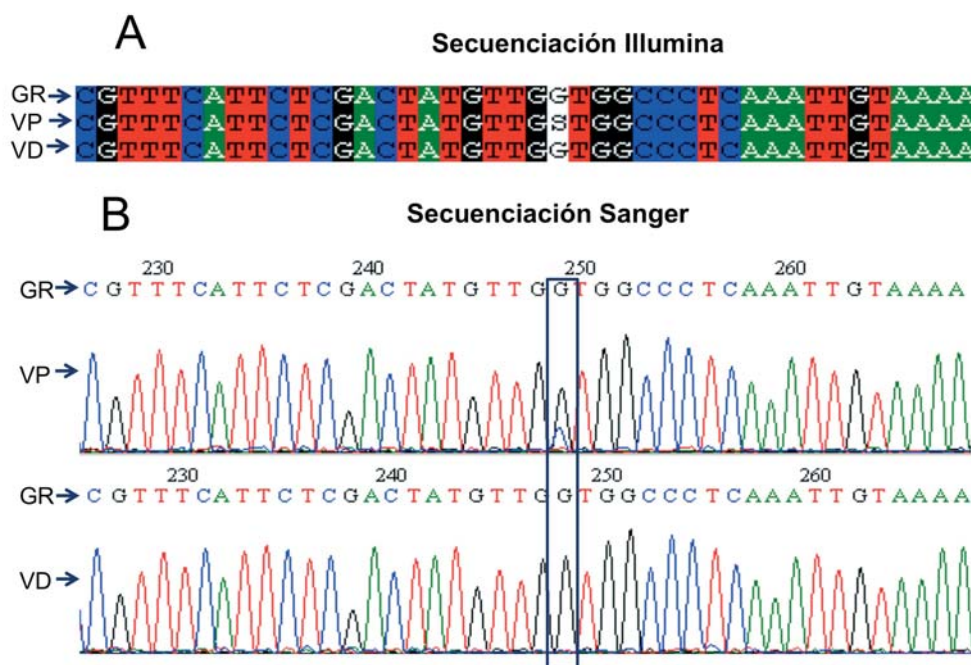
T1 RKS_RP													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
1	chr	position	ref	alt	gene	aaf ivia 032	aaf ivia 202	effect	impact	odon chang	mino chang	qual	DP
2	scaffold 1	25483064	C	G.T	Ciclev10010497m	1	0	DOWNSTRE	MODIFIER			172.254	81
3	scaffold 1	23367184	T	A	Ciclev10010292m	0.5	1	DOWNSTRE	MODIFIER			171.763	114
4	scaffold 1	24006724	A	T	Ciclev10010451m	1	0.5	NON SYNON	MODERATE	caA/caT	Q/H	170.207	88.5
5	scaffold 1	5204824	C	A		0.5	1	INTERGENIC	LOW			165.313	83.5
6	scaffold 1	25740763	G	T.C	Ciclev10010468m	1	0	DOWNSTRE	MODIFIER			162.659	104.5
7	scaffold 1	25481580	G	C.A	Ciclev10010497m	0	1	INTRON	LOW			159.636	99
8	scaffold 1	24851662	A	T	Ciclev10010427m	0.5	1	DOWNSTRE	MODIFIER			159.218	81.5
9	scaffold 1	24009152	T	C	Ciclev10010451m	0.5	1	DOWNSTRE	MODIFIER			158.447	115.5
10	scaffold 1	23723425	T	A.C	Ciclev10007522m	1	0	UPSTREAM	LOW			158.419	109
11	scaffold 1	24166359	A	G.T	Ciclev10008243m	1	0	DOWNSTRE	MODIFIER			158.108	85
12	scaffold 1	23578542	A	G.T	Ciclev10007571m	1	0	DOWNSTRE	MODIFIER			157.107	96
13	scaffold 1	27583359	T	A	Ciclev10009784m	0.5	1	UPSTREAM	LOW			156.512	83
14	scaffold 1	25434303	A	G.C	Ciclev10008847m	0	1	DOWNSTRE	MODIFIER			155.018	110.5
15	scaffold 1	7650479	G	A		0	0.5	INTERGENIC	LOW			154.566	95
16	scaffold 1	24142918	T	C.A	Ciclev10007545m	0	1	UPSTREAM	LOW			154.266	91.5
17	scaffold 1	24878726	T	G	Ciclev10010298m	0.5	1	DOWNSTRE	MODIFIER			153.82	83
18	scaffold 1	24964414	A	C	Ciclev10007942m	0.5	1	DOWNSTRE	MODIFIER			150.831	107
19	scaffold 1	16922439	A	G		0	0.5	INTERGENIC	LOW			140.187	114
20	scaffold 1	24655581	C	T	Ciclev10009827m	0.5	1	DOWNSTRE	MODIFIER			139.152	88
21	scaffold 1	24115346	T	A	Ciclev10007802m	0.5	1	UPSTREAM	LOW			138.818	84
22	scaffold 1	400275	C	T	Ciclev10010482m	0	0.5	UPSTREAM	LOW			137.366	111
23	scaffold 1	486195	T	C	Ciclev10010698m	0	0.5	DOWNSTRE	MODIFIER			136.877	86
24	scaffold 1	7716683	G	A	Ciclev10008680m	0	0.5	DOWNSTRE	MODIFIER			136.608	106
25	scaffold 1	17615847	C	T	Ciclev10010249m	0	0.5	UPSTREAM	LOW			136.122	91
26	scaffold 1	21291359	C	T	Ciclev10010471m	0	0.5	DOWNSTRE	MODIFIER			135.911	87
27	scaffold 1	21134982	A	G	Ciclev10010811m	0	0.5	NON SYNON	MODERATE	Atg/Gtg	M/V	135.329	110
28	scaffold 1	25774157	T	A	Ciclev10010070m	0	0.5	UPSTREAM	LOW			135.233	81
29	scaffold 1	21291335	A	G	Ciclev10010471m	0	0.5	DOWNSTRE	MODIFIER			135.114	83
30	scaffold 1	25774154	C	T	Ciclev10010070m	0	0.5	UPSTREAM	LOW			134.931	81
31	scaffold 1	25774155	T	C	Ciclev10010070m	0	0.5	UPSTREAM	LOW			134.931	81
32	scaffold 1	25774143	C	T	Ciclev10010070m	0	0.5	UPSTREAM	LOW			134.608	85

**Figura 2.** Listado de diferencias entre dos variedades próximas generado mediante comparaciones entre las variantes genómicas. De izquierda a derecha por columnas se especifica el cromosoma afectado, la posición de la variante en el cromosoma, el alelo de referencia, el alelo alternativo, el gen afectado y las frecuencias alélicas, además de otra información sobre los parámetros de calidad que se presentan en las columnas siguientes.





**Figura 3.** Representación de lecturas Illumina de una variedad parental y de la variedad derivada alineadas con respecto al genoma de referencia. Se observa la presencia de un SNP discriminatorio entre ambas variedades.



**Figura 4.** En A se muestra el alineamiento de las secuencias Illumina del genoma de referencia, de una variedad parental y de una variedad derivada. Se observa la presencia de 1 SNP discriminatorio. En B se muestra el alineamiento de las secuencias Sanger de la variedad parental y de la variedad derivada que confirman la presencia del SNP discriminatorio. GR = Genoma de Referencia. VP = Variedad Parental. VD = Variedad Derivada

La estructura y las características de las secuencias distintas se estudiaron individualmente y de entre ellas se seleccionaron las secuencias con mayor probabilidad de discriminación (Figura 5). Además de la aparición o pérdida

de SNPs, otro de los efectos causados por las mutaciones es la aparición de indels de tamaño relativamente menor, que en este caso se presentarían en hemigiosis en los genomas derivados. El poder discriminatorio de los indels, inclu-

so superior al de los SNPs, los convierte en los marcadores candidatos más adecuados (Figura 5). Las alteraciones producidas por las mutaciones también provocan la aparición de deleciones de tamaño considerable y consecuentemente



## Plante con las mejores garantías

Viveros Citroplant, S.L., es un Vivero de cítricos, autorizado y regulado por el Ministerio de Agricultura, para la producción de plantones de cítricos sobre pies tolerantes a la tristeza e injertos libres de virus.

Estamos utilizando las más avanzadas tecnologías, con dos sistemas de cultivo, Tierra e Hidropónico para obtener la mayor calidad en nuestros plantones.

### Sistema Hidropónico

#### Ventajas:

- Estrés al transplante menor
- Crecimiento inicial mucho mayor
- No es necesario el despunte de la planta
- Ideal para doblados y reposiciones
- Porcentaje de faltas cero o nulo

**¡INNOVACIONES!!**

Valencia Midnight Seedless  
Powell Summer Navel®  
Valencia Delta Seedless  
Navel Fukumoto  
Clemenrubi®  
Navel Chislett  
Satsuma Iwasaki

### Nuestra oferta varietal comprende:

Mandarinos, Naranjos, Limoneros, Limas, Pomelos y Patrones

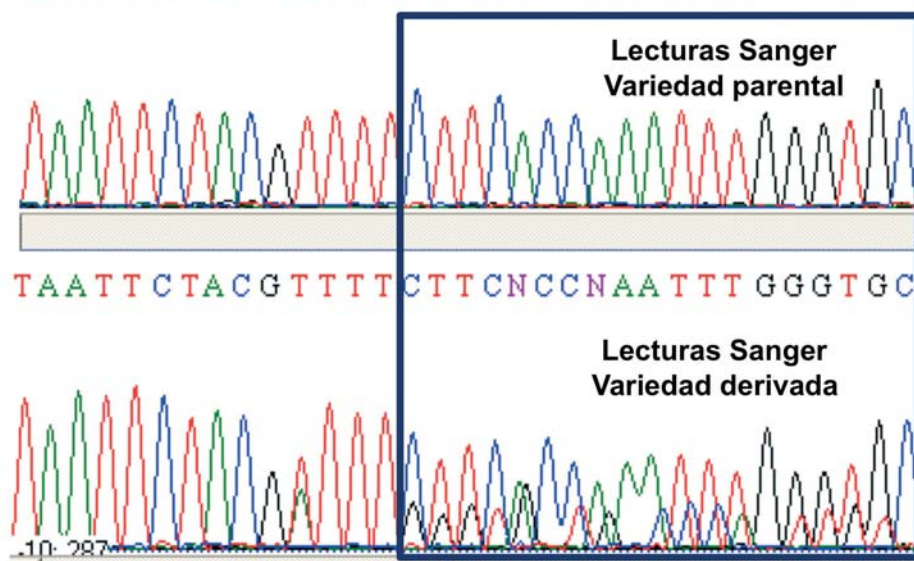


C/ Los Álamos, 16 - 04640 Pulpí (Almería) - Telf. y fax: 950 46 47 21

[citroplant@servicitrus.com](mailto:citroplant@servicitrus.com) - [www.servicitrus.com](http://www.servicitrus.com)

### Secuencia de referencia

TAATTCTACGTTTTCTTCACCAAATTTGGGTGC



**Figura 5.** Secuencias Sanger de una variedad parental y de una variedad derivada alineadas con respecto al genoma de referencia. Se observa una lectura única en la variedad parental y una mezcla de lecturas en una parte de la secuencia de la variedad derivada provocada por la presencia de un indel en la variedad derivada que confirma la presencia de variaciones discriminatorias.

se analizó con detalle la presencia de este tipo de alteraciones estructurales (Figura 6) y el poder discriminatorio de la pérdida de heterocigosidad de las variedades derivadas. La pérdida de heterocigosidad se cuantificó con el número de

SNPs perdidos en una variedad respecto a las demás. La representación gráfica mostró que la pérdida de heterocigosidad se acumulaba en regiones específicas en cada variedad, lo que indicaba la pre-

sencia de enormes fragmentos que contienen secuencias claramente discriminatorias (Figura 7).

Las secuencias candidatas se testaron en un primer ensayo mediante PCR sobre muestras de

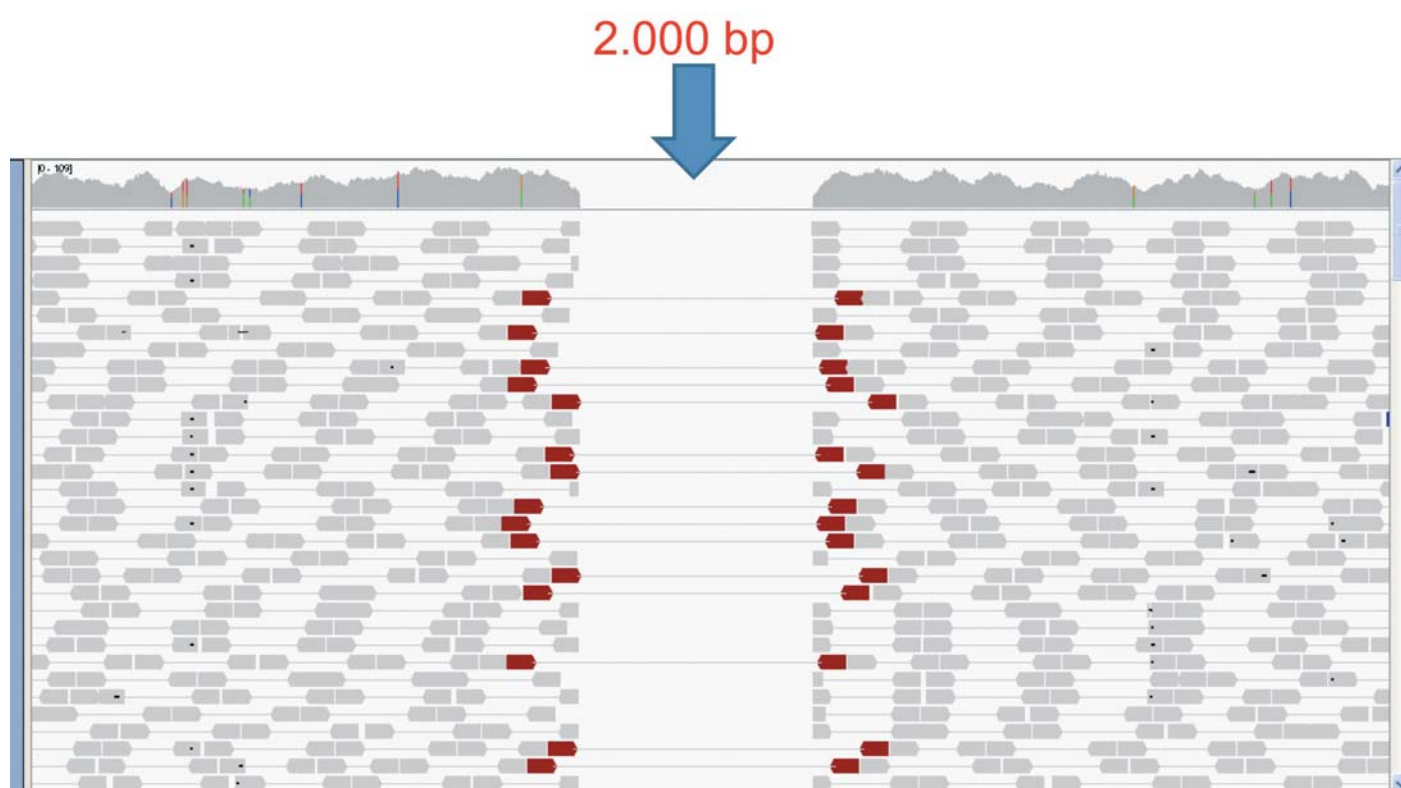
hojas de las variedades problema, en el Centro de Genómica del IVIA. Para validar la capacidad discriminativa, los productos de la amplificación se secuenciaron con la tecnología Sanger (Figuras 4 y 5). Aquellas secuencias que discriminaban sin ambigüedades las variedades ensayadas se analizaron de nuevo en un segundo laboratorio independiente. Por último, se realizó un tercer y último ensayo con multimuestras ciegas para testar la eficacia y el poder del listado de marcadores seleccionados para la autenticación de estas variedades. Una vez perfilado y optimizado el procedimiento, se generó un listado final de marcadores formado por las secuencias que mostraron un 100 % de eficacia en los ensayos ciegos.

### Eficacia del procedimiento

La precisión y capacidad de autenticación del procedimiento que hemos desarrollado son muy elevadas en todas las variedades testadas hasta la fecha. Aunque, en principio, no tenemos evidencia de una reducción en la eficacia, se puede pensar que las limitaciones del procedimiento deberían estar ligadas a la calidad de las secuenciaciones de los genomas, que debe de ser óptima y a la localización de los cambios discriminatorios en zonas accesibles a la secuenciación. También es esperable que la discriminación varietal no esté comprometida con las variaciones clonales e incluso individuales, que presumiblemente son menores que las variaciones entre variedades.

### Conclusiones

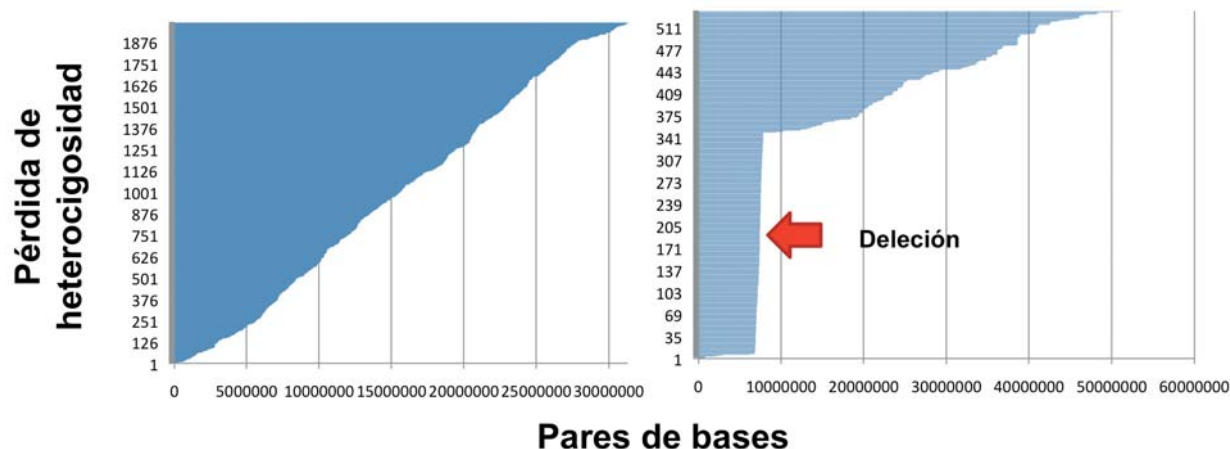
El consorcio CITRUSEQ ha desarrollado protocolos y procedimientos de identificación inequívoca de variedades y especies de cítricos. En este artículo se describe el desarrollo de marcadores de ADN basados en la comparación genómica, que permiten la discriminación rápida y eficaz de variedades comerciales generadas por mutaciones espontáneas e inducidas. Los marcadores moleculares son SNPs, indels de diversos tamaños y otras alteraciones estructurales que incluyen delecciones de grandes fragmentos cromosómicos. El conjunto de los marcadores obtenidos de esta forma proporciona una identificación inequívoca de la variedad problema.



**Figura 6.** Representación de lecturas Illumina en una variedad que muestran un delección de unos 2000 pares de bases con respecto al genoma de referencia.



## Cromosoma 3



**Figura 7.** Pérdida de heterocigosidad de una variedad parental y una variedad derivada. En la variedad parental (izquierda) la pérdida de variabilidad alélica se distribuye uniformemente a lo largo del cromosoma 3. En la variedad derivada se observa una gran pérdida de heterocigosidad provocada por una delección de aproximadamente 2 millones de pares de bases (derecha).

## Agradecimientos

Quisiéramos expresar nuestro agradecimiento a Elena Blázquez, Ángel Boix, Matilde Sancho, Cristina Martínez, Mariano Montoro, Juana Ramírez, Sofía Luque-González, Antonio Prieto e Isabel Sanchís por su inestimable ayuda

en las tareas de campo y laboratorio. Esta investigación ha sido financiada por el Consorcio Citrusseq y el Ministerio de Ciencia e Innovación a través de los proyectos PSE-060000-2009-8 y IPT-010000-2010-43 y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional.

## Referencias

- P. Kumar, V.K. Gupta, A.K. Misra, D. R. Modi and B. K. Pandey (2009). Potential of Molecular Markers in Plant Biotechnology. *Plant Omics Journal*, 2(4): 141-162 (2009)
- M. Talón, A. López-García Usach, J. Terol, M. Cercós, V. Ibañez, A. Herrero-Ortega, J.V Muñoz-Sanz, J.M. Colmenero-Flores1, V. Arbona, L. H. Estornell, J. Carbonell, A. Conesa, J. Dopazo, F. R. Tadeo (2011) CITRUSEQ: una aproximación genómica a la mejora de los cítricos. *Levante Agrícola: Revista internacional de cítricos*, N°. 405, págs. 73-78



### CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS AGRÍCOLAS

Autor: J.A. Jacas y A. Urbaneja (Editores). 496 pag. Ilust. color (2008)

Esta obra, que ha sido dirigida por los editores J. A. Jacas y A. Urbaneja (Unidad Asociada de Entomología UJI-IVIA-CIB), está dividida en 33 capítulos agrupados en 5 secciones (Introducción, Agentes de Control Biológico (CB), CB por tipo de plaga, Cultivos con MIP basado en el CB, y Futuro del CB), recogiendo la información y elaboración de 56 profesores e investigadores en el campo del Control Biológico en nuestro país, que han recopilado desde su propia experiencia para el lector interesado.

**Capítulo 1.** Origen de las plagas e historia del control biológico.

Josep Jacas y Alberto Urbaneja

**Capítulo 2.** Tipos de control biológico y métodos para su implementación.

Alberto Urbaneja y Josep Jacas

**Capítulo 3.** Regulación de poblaciones por enemigos naturales y su aplicación en el control biológico de plagas.

Ramon Albajes y Óscar Alomar

**Capítulo 4.** Artrópodos depredadores.

Alberto Urbaneja, Josep Anton Jacas y Ferran Garcia-Mari

**Capítulo 5.** Insector parasitoides.

Tatiana Pina

**Capítulo 6.** Bacterias entomopatógenas.

Joel González-Cabrera y Juan Ferré

**Capítulo 7.** Hongos entomopatógenos.

Enrique Quesada-Moraga y Cándido Santiago-Álvarez

**Capítulo 8.** Virus entomopatógenos.

Primitivo Caballero y Trevor Williams

**Capítulo 9.** Nematodos entomopatógenos.

Magda Galeano Revert

**Capítulo 10.** Control biológico de ácaros.

Raquel Abad-Moyano, Ernestina Aguilar-Fenollosa y Sara Pascual-Ruiz

**Capítulo 11.** Control biológico de langosta y saltamonte.

Cándido Santiago Álvarez, Pablo Valverde García y Enrique Quesada-Moraga

**Capítulo 12.** Control biológico de trips.

Alfredo Lacasa Plasencia, Juan Antonio Sánchez Sánchez y Carmen María Lacasa Martínez

**Capítulo 13.** Control biológico de chinches.

María Jesús Verdú y José Catalán

**Capítulo 14.** Control biológico de pulgones.

Belén Belliure, Paloma Pérez, Mª Angeles Marcos, José Manuel Michelena y Alfonso Hermoso de Mendoza

**Capítulo 15.** Control biológico de moscas blancas.

Cristina Castañé, Judit Arnó, Francisco Beltrá y Rosa Gabarra

**Capítulo 16.** Control biológico de psyllas.

María José Sarasúa y Jesús Avilla

**Capítulo 17.** Control biológico de cochinillas.

María Jesús Verdú

**Capítulo 18.** Control biológico de noctuidos y lepidópteros.

Tomás Cabello

**Capítulo 19.** Control biológico de minadores.

Elena Llacer y María del Mar Téllez Navarro

**Capítulo 20.** Control biológico de moscas de la fruta.

Ángeles Adán, Pilar Medina, Pedro Del Estal, Elisa Viñuela y Flor Budia

**Capítulo 21.** Control biológico en cítricos.

Alberto Urbaneja, Josep A. Jacas y Ferran Garcia Mari

**Capítulo 22.** Manzana, peral y melocotonero.

Jesús Avilla, Dolores Bosch, Adriana Escudero-Colomar y María José Sarasúa

**Capítulo 23.** Olivo.

Manuel González Núñez

**Capítulo 24.** Vid.

Vicente Marco, Luz Dary Carvajal-Montoya, Esteban García-Ruiz, Fernando Moreno e Ignacio Pérez-Moreno

**Capítulo 25.** Cultivos extensivo en regadío: cereales, maíz y alfalfa.

Xavier Pons y Matilde Eizaguirre

**Capítulo 26.** Pimiento bajo abrigo.

Jan van der Blom

**Capítulo 27.** Tomate.

Rosa Gabarra, Judit Arnó y Jordi Riudavets

**Capítulo 28.** Cucurbitáceas bajo abrigo.

Javier Calvo y José Eduardo Belda

**Capítulo 29.** Cultivo de flor cortada.

José Eduardo Belda Suárez y Ed Moerman

**Capítulo 30.** Aplicación de técnicas moleculares al control biológico de plagas.

Mónica Hurtado, Nuria Agustí y Beatriz Sabater-Muñoz

**Capítulo 31.** Integración del control biológico con otros métodos de control.

Pilar Medina, Adán Adán, Pedro del Estal, Flor Budia y Elisa Viñuela

**Capítulo 32.** Producción de enemigos naturales.

Karel J.F. Bolckmans y José E. Belda

**Capítulo 33.** Situación actual y retos del control Biológico de Plagas.

J.A. Jacas y A. Urbaneja

P.V.P. 58 € (Envíos contra reembolso. I.V.A. incluido).

Gastos de envío aparte)

PARA PEDIDOS: EDICIONES L.A.V., S.L.

Tel.: 96/ 372 02 61 - pedidos@edicioneslav.com